



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 326 349**

⑫ Número de solicitud: 200602590

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **16.11.2006**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2009**

Fecha de la concesión: **23.06.2010**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **07.07.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
07.07.2010

⑲ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
CORPORACIÓN ALIMENTARIA PEÑASANTA, S.A.**

⑳ Inventor/es: **Río Lagar, Beatriz del;
Martín Martín, María Cruz;
Martínez Álvarez, Noelia;
Hernández Magadán, Alfonso y
Álvarez González, Miguel Ángel**

㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ Título: **Detección de bacteriófagos que infectan *Lactobacillus delbrueckii* mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR) y su uso.**

㉓ Resumen:

Detección de bacteriófagos que infectan *Lactobacillus delbrueckii* mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR) y su uso.

La presente invención describe un procedimiento de detección, especialmente en leche, de trazas de bacteriófagos destructivos de la especie *Lactobacillus delbrueckii* utilizada en fermentaciones lácticas industriales, mediante QRT-PCR. La amplificación se realiza utilizando una única pareja de oligonucleótidos cebadores que bajo unas condiciones adecuadas amplifican un fragmento de doble cadena flanqueado por dichos oligonucleótidos. Estos virus son una de las principales causas de fallo en las fermentaciones lácteas industriales, provocando importantes pérdidas económicas. Este procedimiento permite tomar decisiones tales como destinar la leche contaminada hacia procesos donde no intervenga *Lb. delbrueckii* sensibles a los fagos detectados o hacia tratamientos de inactivación, así como la desinfección de la planta de producción. La principal ventaja del procedimiento es la rapidez, junto con la especificidad, la sencillez y la sensibilidad.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Detección de bacteriófagos que infectan *Lactobacillus delbrueckii* mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR) y su uso.

Sector de la técnica

Industria alimentaria. Diagnóstico mediante la técnica de QRT-PCR. El método desarrollado puede ser aplicado en cualquier paso de los procesos de fermentación industrial en los que participen *Lb. delbrueckii* como cultivos iniciadores o como microbiota secundaria, principalmente en el sector lácteo.

Estado de la técnica

Lb. delbrueckii, especie perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico (BAL), es un microorganismo esencial en la Industria Alimentaria como iniciadores de la fermentación, y en particular en la industria láctea. Cualquier agente o factor capaz de retrasar o frenar el crecimiento de dicha bacteria, va a generar dificultades tecnológicas durante los procesos fermentativos en que intervengan (variaciones de pH, prolongación de los tiempos de fermentación, etc.), que conducirá a la obtención de productos de baja calidad o, incluso, a fermentaciones totalmente fallidas. Uno de estos problemas viene determinado por la susceptibilidad de las bacterias a la infección por bacteriófagos, que provocará la lisis de las células, la detención del proceso fermentativo y la pérdida de la materia prima, con las consiguientes consecuencias económicas para la industria. La magnitud de este problema es tal que ya se reconoció en 1935 (Whitehead, HR., and GA Cox. 1935. The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci. N. Z. J. Dairy Sci. Technol. 16:319-320), lo que ha provocado la adopción de medidas de protección que ha permitido mantener el problema dentro de límites manejables, pero, desde luego, no lo ha eliminado. El conocimiento en profundidad de este fenómeno es fundamental para controlar los problemas derivados de las infecciones fágicas, mediante la aplicación de estrategias tendentes a minimizarlos.

La contaminación por fagos es un problema importante tanto cualitativamente como cuantitativamente en la producción de derivados fermentados. Las soluciones que se aplican desde de la industria tanto correctivas como preventivas son medidas que pueden contener los efectos pero sin duda la posibilidad de disponer de un procedimiento rápido de detección supondría una mejora sustancial en la prevención y por tanto en las garantías de la producción que satisfaga todos los indicadores de calidad.

Lb. delbrueckii junto con *Streptococcus thermophilus* son dos especies de BAL de gran importancia en la industria láctea ya que se emplean como iniciadores en la producción de yogur y en algunos tipos de queso. El yogur es un tipo de leche fermentada en la que se utiliza exclusivamente, como cultivo iniciador, una mezcla de *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus*. Que, aunque pueden crecer independientemente, establecen una cooperación beneficiosa o protooperación (Fredrickson, AG. 1997. Behavior or mixed cultures of microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., 74:611-618), de forma que su combinación produce niveles de ácido láctico y acetaldehído superiores a los que se obtendrían por separado, también se reduce el tiempo de latencia y aumenta la producción de biomasa. Debido a este efecto sinérgico se favorece el crecimiento conjunto de ambas especies (Loones, A. 1994. Latís fermentés par les bactéries lactiques. En: Bactéries lactiques. H. de Roissart y RM Luquet (Ed.). Lorica, France. pp: 135-154), que son finalmente las responsables del aroma y textura típicos del yogur. El extenso uso que se ha hecho en los últimos años de *Lb. delbrueckii* como iniciador en la producción de yogures, ha promovido el aumento de fallos en las fermentaciones debido a la selección de bacteriófagos específicos.

Cuando el proceso de acidificación se retrasa durante la fermentación, el procedimiento más usual es analizar la leche inicial para detectar fagos usando métodos microbiológicos estándares (ensayo en placa, test de actividad) (Everson, TC. 1991. Control of phage in the dairy plant. Bull. Int. Dairy Fed. 263:24-28). Estos métodos proporcionan información sobre la sensibilidad del cultivo, pero tienen la desventaja de ser muy lentos (se necesitan varios días). Por otro lado, las técnicas de biología molecular como las sondas de DNA (Moineau, S, J Portier, and S Pandian. 1992. Direct detection of lactococcal bacteriophages in cheese whey using DNA probes. FEMS Microbiol. Lett. 92:169-174) y los ensayos ELISA (Lembke, J, and M Teuber. 179. Detection of bacteriophages in whey by enzyme-linked immunosorbent assay. Milchwissenschaft 34:457-458; Moineau, S, D Bernier, M Jobin, J Hébert, TR Klaenhammer, and S Pandian. 1993. Production of monoclonal antibodies against the major capsid protein of the Lactococcus bacteriophage u136 and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for direct phage detection in whey and milk. Appl. Environ. Microbiol. 59:2034-2040) permiten detectar especies de fagos, pero no detectan ciclos de actividad lítica. Además, estas técnicas moleculares tienen una baja sensibilidad de detección (10^7 PFU/ml).

A comienzos de la década de los 80, la PCR revolucionó la biotecnología molecular y desde entonces se ha convertido en una herramienta vital para de investigación y la detección (Saiki, RK, DH Gelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis, and HA Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491). Una única copia de una secuencia en particular, puede ser detectada y amplificada específicamente. La PCR permite detectar e identificar especies de virus presentes en diferentes tipos de muestras mediante el empleo de oligonucleótidos específicos (Brüssow, H, M Fremont, A Bruttin, J Sidote, A Constable, and V Fryder. 1994. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. Appl. Environ Microbiol. 60:4537-4543). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido aplicada con éxito para la detección de bacteriófagos que infectan *Lb. delbrueckii* (del Rio B, AG Binetti, MC

Martín, M Fernández, AH Magadán, MA Alvarez. 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. Food Microbiol. 24:75-81). En estas reacciones el producto final o amplicon es analizado mediante su visualización en geles de agarosa, lo que alarga el proceso. En los últimos años el desarrollo de la PCR cuantitativa en tiempo real permite la amplificación y la detección en un solo paso y ofrece importantes avances frente a la PCR convencional, como son una mayor especificidad y sensibilidad, no es necesario el procesamiento post-PCR de la muestra y permite cuantificar el material genético de partida.

Descripción de la invención

Descripción breve

El objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de detección de bacteriófagos que infectan cepas de *Lb. delbrueckii* de forma rápida y sensible. La detección se realiza mediante amplificación del gen *mur* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (QRT-PCR) usando una pareja de oligonucleótidos cebadores y una sonda Taqman específicos. Este sistema permite la detección de bacteriófagos que infectan cepas de *Lb. delbrueckii* mediante el uso de los oligonucleótidos específicos y de la sonda Taqman, diseñados a partir de la secuencia del gen *mur* que codifica una muramidasa fágica, y bajo unas condiciones adecuadas para la amplificación específica de los fragmentos de doble cadena flanqueados por los cebadores.

La novedad de la presente invención radica en el uso conjunto de la pareja de oligonucleótidos cebadores, de la sonda Taqman y del procedimiento de QRT-PCR, para la detección e identificación rápida del gen *mur*.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye un kit de detección de bacteriófagos que infectan cepas de *Lb. delbrueckii* por QRT-PCR mediante el gen *mur* de *Lb. delbrueckii* que utilice para ello cualquier combinación posible de cebadores y sonda Taqman que contenga la presente invención. Las ventajas más importantes del procedimiento que se propone, son, además de la especificidad y la sencillez, la altísima sensibilidad y rapidez. En cuanto a la especificidad, por métodos clásicos es necesario realizar un ensayo para cada tipo de fago que se quiera detectar y el resultado siempre dependerá del tipo de cepa que se utilice como hospedadora, ya que estos fagos tienen un estrechísimo rango de hospedador, de forma que, en general, sólo son capaces de infectar determinadas cepas de una especie. Además, de su probada y total especificidad, es mucho más sencillo y por tanto mucho más fácil de automatizar. Partiendo de una placa de lisis aislada o de cualquier tipo de muestra se puede conocer en un espacio de tiempo relativamente pequeño, si la muestra contiene algún fago que infecte *Lb. delbrueckii*.

El segundo tema clave, es que, como se ha dicho, la detección de fagos en la leche de partida en la Industria Láctea es difícil de llevar a cabo en un tiempo razonable con los métodos tradicionales, basados en el desarrollo de estos virus sobre céspedes de bacterias presuntamente sensibles o en la falta de acidificación de la muestra. Así, la principal ventaja sería la rapidez, ya que para la aplicación de métodos tradicionales se necesitan días, siendo absolutamente inviable la inmovilización de la leche durante estos periodos de tiempo, y por nuestro método treinta minutos, un margen de tiempo que si es razonable. Además, el método de la QRT-PCR tiene la ventaja sobre la PCR tradicional que se puede monitorizar la reacción de amplificación según está sucediendo sin necesidad de la posterior visualización de los fragmentos amplificados en geles de agarosa o poliacrilamida. Hecho que también contribuye a reducir el tiempo del análisis. Así, partiendo de una muestra de 1 µl de leche, se puede conocer, en unos treinta minutos, si ésta está contaminada con fagos que pueden interferir en los procesos fermentativos de la leche. Igualmente se puede analizar alimentos ya elaborados, por ejemplo el yogur. La detección de fagos en los productos finales podría recomendar una desinfección a fondo de la planta, incluso aunque no se hubiesen apreciado problemas en la fermentación, con el fin de evitar dificultades en fermentaciones posteriores. Del mismo modo, podrían ser utilizados para realizar un análisis de puntos críticos en las instalaciones lo que nos permitiría conocer cual es el foco de la contaminación.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Comparación de las secuencias nucleotídicas del gen *mur* del fago LL-H (número de acceso Genbank M96254) con las secuencias de los genes equivalentes de los fagos mv4 (número de acceso Genbank Z26590) y mv1 (número de acceso Genbank M60167). En negro se indican los nucleótidos idénticos en los tres bacteriófagos. En cursiva se indican las regiones donde se diseñaron los oligonucleótidos y la sonda.

Figura 2.- QRT-PCR de diluciones seriadas del DNA del fago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii*

Figura 3.- Relación entre la CT y PFU/ml del bacteriófago LL-H en muestras de leche infectada artificialmente.

Descripción detallada

La presente invención consiste en un procedimiento de detección de bacteriófagos de *Lb. delbrueckii* mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (QRT-PCR), a partir de muestras de leche o de derivados de su fermentación, y en una única reacción, determinar la presencia de bacteriófagos destructivos que infectan a dicha especie a través de la detección de genes equivalentes a los que se describen más adelante. Se pueden detectar e identificar rápida y eficazmente, mediante el uso de una pareja de oligonucleótidos y bajo unas condiciones adecuadas para la amplificación específica de los fragmentos de doble cadena flanqueados por esta pareja, la presencia de fagos que atacan a *Lb. delbrueckii*, microorganismo utilizado normalmente en las fermentaciones lácteas industriales.

Diseño de los cebadores y de la reacción QRT-PCR

El diseño de los cebadores adecuados que permitan la amplificación específica del fragmento de DNA deseado, comienza con la comparación de las secuencias nucleotídicas del gen que se desea amplificar, procedentes de distintos fagos que infectan la misma especie bacteriana. Esta comparación nos permite identificar las zonas conservadas que serán comunes para estos fagos.

Para los bacteriófagos que infectan *Lb. delbrueckii* se seleccionó el gen *mur* (número de acceso Genbank M96254), que codifica un muramidasa fágica, ya que es el gen mas conservado entre las secuencias disponibles de las bases de datos (del Rio B, AG Binetti, MC Martín, M Fernández, AH Magadán, MA Alvarez. 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. Food Microbiol. 24:75-81). Comparamos la secuencia nucleotídica del gen *mur* del fago LL-H con los genes *lysA* de los bacteriófagos mv4 y mv1 (número de acceso Genbank Z26590 y M60167, respectivamente). En la zona más conservada de estos genes (Figura 1) se diseñaron como parte de la presente invención los oligonucleótidos cebadores específicos cuya secuencia se muestra a continuación:

5'- ACAGCTCCCGGGCTAACC -3' (oligo QPCR-1, SEQ ID NO1)

5'- CCAAACCGCGCAAAGTG -3' (oligo QPCR-2, SEQ ID NO2)

Estos oligonucleótidos pueden ser directamente utilizados para la reacción de QRT-PCR empleando SYBR green como fluoróforo.

Además con el fin de aumentar la especificidad de la reacción, se diseñó una sonda Taqman en la región comprendida entre los oligonucleótidos cebadores QPCR-1 y QPCR-2 anteriormente descritos. Así se diseñó, como parte de la presente invención, la sonda cuya secuencia se muestra a continuación:

5'- CCTCTACACTCACGCCTA-3' (sonda Taqman TMGB-1, SEQ ID NO3)

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de amplificación del gen *mur* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR), en adelante procedimiento de la presente invención, basado en el uso de una pareja de oligonucleótidos cebadores específicos del gen *mur* del fago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* entre otros, los oligonucleótidos QPCR-1 y QPCR-2, y de una sonda específica TMGB-1 y bajo unas condiciones adecuadas de amplificación del fragmento de doble cadena flanqueado por dichos oligonucleótidos y bajo las siguientes condiciones preferentes:

✓ un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos.

✓ 40 ciclos:

- Desnaturalización a 94°C (5 segundos)
- Anillamiento y extensión a 60°C (30 segundos)

Hay que señalar que las condiciones de la reacción QRT-PCR descritas anteriormente pueden adaptarse fácilmente por un experto medio de la técnica de la presente invención dependiendo del termociclador, pudiéndose modificar las condiciones de desnaturalización, la temperatura de anillamiento, la temperatura de extensión, la polimerasa así como la secuencia de los cebadores, y de la sonda etc., de tal forma que estos procedimientos de amplificación del gen *mur* y los genes equivalentes por PCR forman parte de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un kit de diagnóstico por PCR del gen *mur* que contenga la pareja de oligonucleótidos cebadores y la sonda Taqman de la presente invención.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la pareja de oligonucleótidos cebadores, de la sonda Taqman y del procedimiento de la presente invención para la amplificación por QRT-PCR del gen *mur* y los genes equivalentes. Esto permitirá detectar bacteriófagos que ataquen *Lb. delbrueckii* y cuantificar su presencia de forma que se puedan tomar decisiones en el ámbito de la calidad alimentaria, preferentemente en el sector de los productos lácteos. Es decir, se podrá tomar decisiones sobre su destino hacia el consumo directo o hacia distintos procesos fermentativos, permitiendo el análisis de dichos procesos y de los productos resultantes. La detección de fagos en puntos críticos del procesamiento de la leche podría aconsejar la desinfección de la planta de producción o de alguno de sus componentes.

Amplificación del bacteriófago LL-H mediante FAST- QRT-PCR a partir de DNA

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador 7500 FAST REAL TIME PCR SYSTEM (Applied Biosystem). Se utilizó un kit Taqman Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem), en el que se incluyen los dideoxinucleótidos el enzima AmpliTaq gold y el tampón de reacción y se añadieron 900 nM de cada cebador y 200 nM de sonda en 10 μ l totales de reacción.

Se aisló DNA del fago LL-H mediante el protocolo descrito por Binetti y Colaboradores (Binetti, AG, B del Rio, MC Martin, MA Alvarez 2005. Detection and characterization of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages by use of the antireceptor gene sequence. Appl. Environ. Microbiol. 71:6096-6103), y se hicieron diluciones sucesivas con un orden de magnitud de diferencia. A la mezcla de reacción previamente descrita se le añadió 1 μ l de la muestra de DNA de la dilución correspondiente.

Las condiciones de la reacción son las siguientes:

✓ un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto.

✓ 40 ciclos:

- Desnaturalización a 94°C (5 segundos)
- Anillamiento y extensión a 60°C (30 segundos)

Tras la amplificación, se representó gráficamente el valor Ct frente a la dilución correspondiente, obteniéndose la recta de regresión (Figura 2). Según se demuestra, hemos podido establecer una relación lineal entre la concentración de DNA utilizado para la reacción de PCR y la Ct obtenida.

Ejemplo de realización de la invención**Ejemplo 1***Cuantificación del bacteriófago LL-H en leche mediante FAST RTQ-PCR*

El ensayo en placa es el método tradicional para la cuantificación de bacteriófagos. Sin embargo, los datos obtenidos con este método pueden resultar inexactos, debido a la interpretación subjetiva de los resultados. La aplicación de la QRT- PCR podría ser un ensayo rápido y más eficaz para la cuantificación del título de fagos en muestras de leche. Para comprobar la eficacia del método que se patenta, obtuvimos un lisado del fago LL-H como se describe en (del Rio B, AG Binetti, MC Martín, M Fernández, AH Magadán, MA Alvarez. 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. Food Microbiol. 24:75-81). Se realizó una infección artificial en leche desnatada al 10% (w/v) y posteriormente se hicieron diluciones seriadas. Se tituló cada dilución mediante ensayo en placa con la cepa sensible al fago (*Lb. delbrueckii* LKT). Posteriormente, se cuantificó la concentración de fago mediante amplificación por QRT-PCR utilizando las condiciones de reacción descritas anteriormente.

Tras la amplificación, se representó gráficamente la Ct frente al título de fago LL-H en cada una de las diluciones, obteniéndose y la recta de regresión correspondiente (Figura 3). Según se demuestra, hemos podido establecer una relación lineal entre el título de fago en una suspensión de fago y la CT obtenida.

Ejemplo 2*Aislamiento de bacteriófagos de *Lb. delbrueckii* a partir de muestras reales y detección mediante RTQ-PCR*

Para comprobar que el método desarrollado funciona con otros fagos distintos a aquellos en los que se basó el diseño de los cebadores y la sonda, se realizó un muestreo mediante enriquecimientos con cepas de *Lb. delbrueckii* *sup. bulgaricus*, de yogures y leche en polvo suministrados por la empresa colaboradora. Se aislaron 10 bacteriófagos diferentes y se prepararon suspensiones concentradas. Posteriormente, se procedió de igual forma que en el ejemplo 1, comprobándose que efectivamente, el procedimiento desarrollado permite la detección y la cuantificación de fagos aislados a partir de muestras reales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de detección de fagos que infectan *Lb. delbrueckii* **caracterizado** por el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) mediante una única reacción con los oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2, y sonda Taqman comprendida entre los oligonucleótidos cebadores indicados de secuencia SEQ ID NO3 específicos del gen *mur* del bacteriófago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* y sus equivalentes en otras especies bacterianas.
- 10 2. Procedimiento de detección de fagos que infectan *Lb. delbrueckii* según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la técnica de QRT-PCR para la amplificación de los fragmentos de doble cadena se realiza con las parejas de oligonucleótidos específicos y una sonda Taqman según la reivindicación 1 del gen *mur* del bacteriófago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* y sus equivalentes en otros fagos y bajo las siguientes condiciones preferentes:
 - 15 ● un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos.
 - 40 ciclos:
 - Desnaturalización a 94°C (5 segundos)
 - 20 ● Anillamiento y extensión a 60°C (30 segundos).
- 25 3. Procedimiento de detección de fagos que infectan *Lb. delbrueckii* según las reivindicaciones 1 a 2 **caracterizado** por utilizar como material de partida sustratos, tanto vegetales como animales, susceptibles de fermentaciones alimentarias.
- 30 4. Procedimiento de detección de fagos que infectan *Lb. delbrueckii* según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el material de partida productos de origen animal que se utiliza es leche o derivados lácteos.
- 35 5. Procedimiento de detección de fagos que infectan *Lb. delbrueckii* según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el material de partida productos de origen animal que se utiliza es carne o pescado susceptible de ser sustrato de fermentación.
6. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos del gen *mur* del bacteriófago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* y sus equivalentes en otros fagos, **caracterizados** por la secuencia SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2, y porque permiten la amplificación específica de dichos genes por QRT-PCR según el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 5.
- 40 7. Sonda Taqman específica del gen *mur* del bacteriófago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* y sus equivalentes en otros fagos, **caracterizado** por la secuencia SEQ ID NO3 y porque permiten la amplificación específica de dichos genes por QRT-PCR según el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 5.
- 45 8. Kit de diagnóstico por QRT-PCR para la detección de fagos que infectan *Lb. delbrueckii* **caracterizado** por amplificar el gen *mur* del bacteriófago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* y sus equivalentes en otros fagos, por el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 5 y que contenga los oligonucleótidos específicos según las reivindicaciones 6 y 7.
- 50 9. Uso del procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5 y de los oligonucleótidos específicos para la amplificación por QRT-PCR del gen *mur* del bacteriófago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* y sus equivalentes en otros fagos, según las reivindicaciones 6 a 8 para la detección de fagos que infectan *Lb. delbrueckii* en alimentos en general y productos vegetales y/o animales en particular, así como en aditivos de los mismos y en los cultivos iniciadores.
- 55 10. Uso del procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5 y de los oligonucleótidos específicos para la amplificación por QRT-PCR del gen *mur* del bacteriófago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* y sus equivalentes en otros fagos, según las reivindicaciones 6 a 9 en muestras de leche para la posterior decisión del uso la misma.
- 60 11. Uso del procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5 y de los oligonucleótidos específicos para la amplificación por QRT-PCR del gen *mur* del bacteriófago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* y sus equivalentes en otros fagos, según las reivindicaciones 6 a 9 para la detección en muestras productos lácteos fermentados, entre ellos el yogur.

ES 2 326 349 B1

Mv4	AACCCGAAGGGGGCCAAGCAGGTGGACAGCTCCAGGGCTAACCACCTCTACACTCATGCC	60
mv1	AACCG-AAGGGGGCCAAGCAGGTGGACAGCTCCAGGGCTAACCACCTCTACACTCATGCC	59
LL-H	AACCCGAAGGGCTCAAAGCAGGTGGACAGCTCCCGGGCTAACCACCTCTACACTCACGCC	60
mv4	TACCATTTTCGCGCG-TTTTGGCTCATCTGTTAGCCGCGCCAAAAAGAAGCGGCTTACTT	120
mv1	TACCATTTTCGCGCAGTTTGGCTCATCTGTTAGCCGCGCCAAAAAGAAGCGGCTTACTT	120
LL-H	TACCAGTTTTCGCGGTTTGG-ATCCTCTGTAGCCAGGCCAAAAAGGAAGCGACCTACTT	120
mv4	CCTTAAGGAAGCCAAGAAGCAAGACATTAGCAAGAAACGGATGCTTTGGCTAGACTGGGA	180
mv1	CCTTAAGGAAGCCAAGAAGCAAGACATTAGCAAGAAACGGATGCTTTGGCTAGACTGGGA	180
LL-H	CATCAAGGAAGCTAAGAAGGAAGACATTAGCCAAAAGCGGATCGTTTGGCTGGACTGGGA	180
mv4	AGCCGGTAGCGGCAATGTGGTAACTGGGTCAAAGTCATCCAACACGGCGGCAATCCTGGA	240
mv1	AGCCGGTAGCGGCAATGTGGTAACTGGGTCAAAGTCATCCAACACGGCGGCAATCCTGGA	240
LL-H	ATCCGGTAGCGGCAACACCGTGACCGGGTCAAAGCATCCAACACGTGGCAATCCTGGC	240
mv4	CTTTATGGACGCGATTAAAGCCGAGGCTGGCGGCCGGGTCTCTATAGCGGTGCATCCCT	300
mv1	CTTTATGGACGCGATTAAAGCCGAGGCTGGCGGCCGGGTCTCTATAGCGGTGCATCCCT	300
LL-H	ATTTATGGATGCGATTAAAGCCGCTGGCTGGCGTCTCTGGGTCTACTCTGGTGCATCCCT	300
mv4	GATGCGGACGGCGATTGACACCAAGCAGGTGGTAAAAAGTATGGCACCTGTCTCTGGGT	360
mv1	GATGCGGACGGCGATTGACACCAAGCAGGTGGTAAAAAGTATGGCACCTGTCTCTGGGT	360
LL-H	GCTGCGGACTGCCATCGACACTGCGCAGGTGGTCAAAGTATGGCACCTGCCTCTGGGT	360
mv4	GGCAAGCTACCCGACCATGGCGGCAGTCTCCACGGCTGACTTTGGATACTTCCCGTCAAT	420
mv1	GGCAAGCTACCCGACCATGGCGGCAGTCTCCACGGCTGACTTTGGATACTTCCG-TCAAT	419
LL-H	AGCTTCCTACCTACGATGGCGGCAGTCTCATCAGCAGACTTCCGCTACTTCCCGTCTAT	420
mv4	GGACGGGGTCGCCATCTGGCAGTTTACCAGTAACTGGCATGGCCTGGACGTAGACGGGAA	480
mv1	GGACGGGGTCGCCATCTGGCAGTTTACCAGTAACTG-CATGGCCTGGACGTAGACGGGAA	479
LL-H	GGACGGGGTGGCTATCTGGCAGTTACCAGCAACTGGAAGGGCTGGGCGTAGACGGCAA	480
mv4	CGTTGCTCTGGTTGACCTCAACAGCGAGAACAAGCCTAAAGCCGAGGTCAAGCCAAAGAC	540
mv1	CGTTGCTCTGGTTGACCTCAACAGCGAGAACAAGCCTAAAGCCGAGGTCAAGCCAAAGAC	540
LL-H	TTTGGCACTGGTTGATCTCAACAGCGACGCTAAGCCTAAAGCAGAGGCCAAACCTAAGCC	540
mv4	AAAGCAAAAGGCCACGGCGACTGACTTCCATGGTGTGTCAAAGTAAAGAGCCTGGGGGC	600
mv1	AAAGCAAAAGGCCACGGCGACTGACTTCCATGGTGTGTCAAAGTAAAGAGCCTGGGGCT	600
LL-H	AAAGCCTAAAGCCACCTCCAATGACTTTAACCACGTTGTCAAGGTCAAGAATCTTGGCCC	600
mv4	TAGCAAGGCCAGCTGGAAGGTTCCGGCTGTCTCAAAGGATGGCCACTACACCGAAAGCTA	659
mv1	AG-CAAGGCCAGCTGGAAGGTTCCGGCTGTCTCAAAGGATGGCCACTACACCGAAAGCTA	659
LL-H	GGGCAAGGCCAGCTGGAAGTCCGGTGTCTCAAAGGATGGTCACTACACCAACAGCTA	659

FIGURA 1

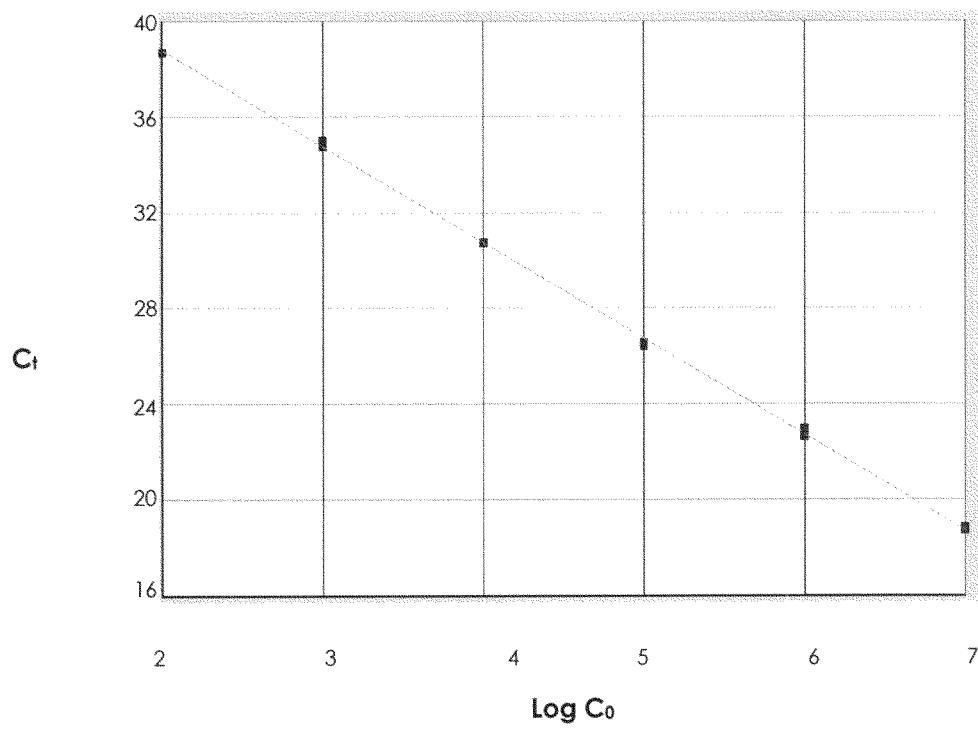


FIGURA 2

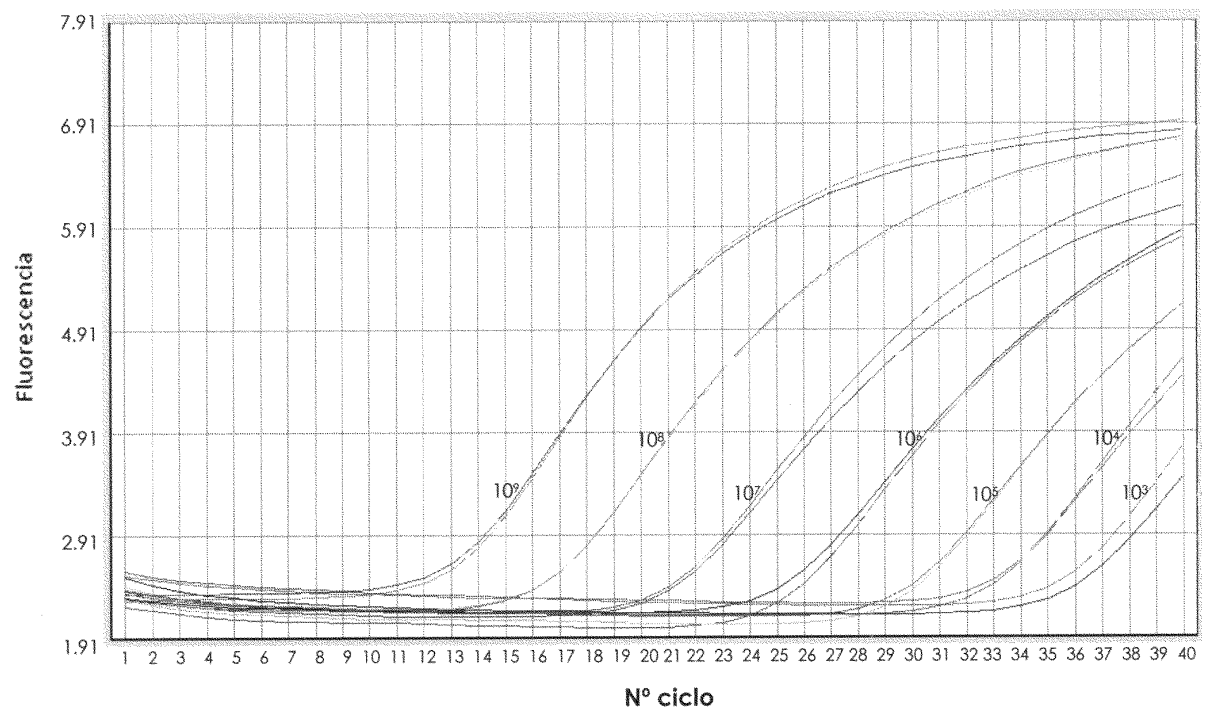


FIGURA 3

ES 2 326 349 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS	
5	Alvárez González, Miguel Ángel Hernández Magadán, Alfonso Martínez Álvarez, Noelia Martín Martín, M ^a Cruz Del Río Lagar, Beatriz	
10	<120> DETECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS QUE INFECTAN <i>Lactobacillus delbrueckii</i> MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QRT-PCR) Y SU USO.	
15	<130> quantpcr	
	<160> 6	
20	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 18	
25	<212> DNA	
	<213> Bacteriophage LL-H	
	<400> 1	
30	acagctcccg ggctaacc	18
	<210> 2	
35	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Bacteriophage LL-H	
40	<400> 2	
	ccaaaccgcg caaagtg	17
45	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Bacteriophage LL-H	
50	<400> 3	
	cctctacact cagccta	18
55	<210> 4	
	<211> 659	
	<212> DNA	
60	<213> Bacteriophage LL-H	
65		

ES 2 326 349 B1

<400> 4

	aaccccaagg	cgtcaaagca	ggtggacagc	tcccgggcta	accacctcta	cactcacgcc	60
	taccactttg	cgcggtttgg	atcctctgtc	agccaggcca	aaaaggaagc	gacctacttc	120
5	atcaaggaag	ctaagaagga	agacattagc	caaaagcgga	tcgtttggct	ggactgggaa	180
	tccggtagcg	gcaacaccgt	gaccgggtca	aaagcatcca	acacgtcggc	aatcctggca	240
	tttatggatg	cgattaaagc	cgctggctgg	cgtcctgggc	tctactctgg	tgcatccctg	300
	ctgcggactg	ccatcgacac	tgcgcagggtg	gtcaaaaagt	atggcacctg	cctctgggta	360
	gcttcctacc	ctacgatggc	ggcagtctca	tcagcagact	tcgctacttt	cccgtctatg	420
10	gacgggggtg	ctatctggca	gttcaccagc	aactggaagg	gcctgggcgt	agacggcaat	480
	ttggcactgg	ttgatctcaa	cagcgacgct	aagcctaaag	cagaggccaa	acctaagcca	540
	aagcctaaag	ccacctccaa	tgactttaac	cacgttgtca	aggtcaagaa	tcttggcccg	600
	ggcaaggcca	gctggaaagt	ccggttgctc	tcaaaggatg	gtcactacac	caacagcta	659

<210> 5

<211> 659

<212> DNA

20 <213> Bacteriophage mv4

<400> 5

	aacccgaagg	gggccaagca	ggtggacagc	tccagggcta	accacctcta	cactcatgcc	60
25	taccatttcg	cgcggttttg	ctcatctgtt	agccgcgcca	aaaaagaagc	ggcttacttc	120
	cttaaggaag	ccaagaagca	agacattagc	aagaaacgga	tgctttggct	agactgggaa	180
	gccggtagcg	gcaatgtggt	aactgggtca	aagtcatcca	acacggcggc	aatcctggac	240
	tttatggacg	cgattaaagc	cgcaggctgg	cggccgggtc	tctatagcgg	tgcatccctg	300
30	atgcggacgg	cgattgacac	caagcagggtg	gtaaaaaagt	atggcacctg	tctctgggtg	360
	gcaagctacc	cgaccatggc	ggcagtctcc	acggctgact	ttggatactt	cccgtcaatg	420
	gacgggggtc	ccatctggca	gtttaccagt	aactggcatg	gcctggacgt	agacgggaac	480
	gttgctctgg	ttgacctcaa	cagcgagaa	aagcctaaag	cagagggtcaa	gccaaagaca	540
	aagcaaaaag	ccacggcgac	tgacttccat	ggtgttgtca	aagtaaagag	cctgggggct	600
35	agcaaggcca	gctggaagggt	tcggctgctc	tcaaaggatg	gccactacac	cgaaagcta	659

<210> 6

<211> 656

40 <212> DNA

<213> Bacteriophage mv1

<400> 6

45	aaccgaaggg	ggccaagcag	gtggacagct	ccagggtctaa	ccacctctac	actcatgcct	60
	accattttcg	gcagtttttg	ctcatctgtt	agccgcgcca	aaaaagaagc	ggcttacttc	120
	cttaaggaag	ccaagaagca	agacattagc	aagaaacgga	tgctttggct	agactgggaa	180
	gccggtagcg	gcaatgtggt	aactgggtca	aagtcatcca	acacggcggc	aatcctggac	240
50	tttatggacg	cgattaaagc	cgcaggctgg	cggccgggtc	tctatagcgg	tgcatccctg	300
	atgcggacgg	cgattgacac	caagcagggtg	gtaaaaaagt	atggcacctg	tctctgggtg	360
	gcaagctacc	cgaccatggc	ggcagtctcc	acggctgact	ttggatactt	ccgtcaatgg	420
	acgggggtcg	catctggcag	tttaccagta	actgcatggc	ctggacgtag	acgggaacgt	480
55	tgctctgggt	gacctcaaca	gcgagaacaa	gcctaaagcc	gaggtcaagc	caaagacaaa	540
	gcaaaaggcc	acggcgactg	acttccatgg	tggtgtcaaaa	gtaaagagcc	tggggctagc	600
	aaggccagct	ggaagggttcg	gctgctctca	aaggatggcc	actacaccga	aagcta	656

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 326 349

⑫ Nº de solicitud: 200602590

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 16.11.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/70 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	DEL RIO, B. et al., "Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk.", FOOD MICROBIOLOGY, 2007 Feb, Vol. 24, No. 1, páginas 75-81, [Epub.: 17.03.2006], Resultados y Discusión, 'Primer design', Tabla 2.	1-11
Y	ZAGO, M. et al., "Detection and identification of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis bacteriophages by PCR.", THE JOURNAL OF DAIRY RESEARCH, 2006 May, Vol. 73, No. 2, páginas 146-153, [Epub.: 16.01.2006], Materiales y Métodos, 'Primer design and PCR conditions', Tabla 2.	1-11
A	VASALA, A. et al., "Genetic and biochemical characterization of the Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis bacteriophage LL-H lysin.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1995, Vol. 61, No. 11, páginas 4004-4011, todo el documento.	1-11
A	LUNDE, M. et al., "Use of real-time quantitative PCR for the analysis of phiLC3 prophage stability in lactococci.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2003, Vol. 69, No. 1, páginas 41-48, todo el documento.	1-11
A	EDELMAN, D.C. et al., "Real-time PCR provides improved detection and titer determination of bacteriophage.", BIOTECHNIQUES, 2003, Vol. 35, No. 2, páginas 368-375, todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

23.09.2009

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-11	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	del Río, B. et al., Food Microbiol., (2007 Feb), 24(1): 75-81. [Epub.: 17.03.2006]	17.03.2006
D02	Zago, M. et al., J. Dairy Res., (2006 May), 73(2): 146-53. [Epub.: 16.01.2006]	16.01.2006
D03	Vasala, A. et al., Appl. Environ. Microbiol., (1995), 61(11): 4004-11.	1995
D04	Lunde, M. et al., Appl. Environ. Microbiol., (2003), 69(1): 41-8.	2003
D05	Edelman, D.C. et al., Biotechniques, (2003), 35(2): 368-75.	2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).**

1.1. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-11, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).**2.1. Reivindicación independiente 1.**

2.1.1. Los documentos D1 y D2 se consideran que representan el estado de la técnica más próximo. En D1 se describe un procedimiento de detección de bacteriófagos que infectan a *Lactobacillus delbrueckii* basado en una reacción PCR. Los cebadores Lb1 y Lb2, empleados en dicho procedimiento, fueron diseñados a partir del estudio comparativo de secuencias altamente conservadas en los genomas de fagos que infectan a *Lb. delbrueckii*, en concreto, a partir de la comparación de las secuencias del gen mur del fago LL-H y del gen lysA de los fagos mv1 y mv4. En D2 se describe un procedimiento de detección e identificación de bacteriófagos que infectan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* basado en una reacción PCR caracterizada por el uso de los cebadores que permiten amplificar específicamente secuencias de los genes g17, hol y mur del bacteriófago LL-H. En particular, los cebadores LDYSfor y LDYSrev permiten la amplificación de un fragmento de 469pb del gen mur de LL-H.

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo procedimiento de detección de bacteriófagos que infectan *Lactobacillus delbrueckii*.

2.1.3. La solución propuesta es el procedimiento de la reivindicación 1. Para valorar adecuadamente la actividad inventiva de esta solución es necesario considerar si, a la fecha de prioridad de la solicitud de patente, partiendo del estado de la técnica más próximo, el experto en la materia intentaría aplicar dicha solución con una expectativa razonable de éxito. Además, es preciso considerar si se plantearon dificultades técnicas no previsibles durante la puesta en práctica de dicho procedimiento.

El procedimiento de la invención se basa en la amplificación de una región del genoma de diferentes bacteriófagos que infectan *Lb. delbrueckii* caracterizada porque su secuencia está altamente conservada en todos ellos. En concreto, los cebadores de la invención, QPCR-1 (SEQ ID No 1) y QPCR-2 (SEQ ID No 2), permiten la amplificación de una secuencia conservada en el gen mur del fago LL-H (cf. D3; número de acceso en Genbank M96254) y en el gen homólogo lysA de los fagos mv1 y mv4 (página 7, línea 12-19; Figura 1).

Hoja adicional

El análisis comparativo de las secuencias QPCR-1 (SEQ ID No 1) y QPCR-2 (SEQ ID No 2) con la secuencia del gen mur (2.497pb) revela que estas secuencias coinciden con las comprendidas entre los nucleótidos 1.591-1.608 y 1.645-1.629 del gen, de manera que el amplicón generado a partir de estos cebadores es un fragmento de 55pb. Una comparación análoga de las secuencias de los pares de cebadores Lb1-Lb2 y LDYSfor-LDYSrev, empleados en los procedimientos descritos en D1 y D2, pone de manifiesto que las secuencias de Lb1 y Lb2 coinciden con las de las posiciones 1.596-1.620 y 2.216-2.192 de mur y las de LDYS-for y LDYS-rev con las de las posiciones 1601-1619 y 2070-2052, de modo que los amplicones generados son fragmentos del gen mur de 621pb y de 469pb respectivamente (cf. D1: Resultados y Discusión, 'Primer design', Tabla 2. D2: Materiales y Métodos, 'Primer design and PCR conditions', Tabla 2.). En resumen, tanto el procedimiento reivindicado como los procedimientos descritos en D1 y D2 consisten básicamente en la amplificación de la misma región del genoma (secuencias de los genes mur y lysA) de bacteriófagos que infectan a Lb. delbrueckii (fagos LL-H, mv1, mv4). Además, los cebadores QPCR-1 (invención), Lb1 (D1) y LDYSfor (D2) comparten parcialmente sus respectivas secuencias. Por consiguiente, las características técnicas relevantes que diferencian al procedimiento de la invención de los descritos en D1-D2 son los pares de cebadores específicos y la reacción PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR) caracterizada por el uso de la sonda Taqman TMGB-1 (SEQ ID No 3) aplicados en el procedimiento reivindicado. No obstante, en la descripción de la solicitud no se indica explícitamente cuál es el efecto técnico sorprendente e inesperado derivado del uso de los cebadores QPCR-1 y QPCR-2 de la invención que causa una mejoría evidente en la detección de bacteriófagos que infectan a Lb. delbrueckii con respecto al uso de los pares de cebadores Lb1-Lb2 y LDYSfor-LDYSrev empleados en el estado de la técnica (cf. D1, D2), salvo el tamaño del fragmento amplificado (amplicón) obtenido en cada uno de los casos (55pb, 621pb y 469pb, respectivamente). Por otro lado, la aplicación de reacciones QRT-PCR para la identificación y detección de diferentes bacteriófagos está ampliamente documentada en el estado de la técnica (cf. D4, D5). Como consecuencia de todo ello, se considera que la solución propuesta por el objeto de la reivindicación independiente 1 es una alternativa no inventiva con relación a las soluciones existentes previamente que no requeriría de la aplicación de conocimientos técnicos inventivos por parte del experto en la materia. Además, la puesta en práctica de dicha solución no presentó ninguna dificultad técnica imprevisible que, en el caso de haberse planteado, hubiera cuestionado la expectativa por parte del experto en la materia de llevarla cabo con éxito.

Por consiguiente, el objeto de la reivindicación independiente 1 no es inventivo. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el objeto de las reivindicaciones dependientes 2-11 no es inventivo.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-11, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patente.